

アンドロゲンレセプター・金コロイド法 による電子顕微鏡学的研究

奈良県立医科大学第2解剖学教室

中山正成, 奥田喜一, 別府謙一
橋本研二, 山本浩司

ELECTRON MICROSCOPIC STUDY ON COLLOIDAL GOLD LABELED ANDROGEN RECEPTOR

MASANARI NAKAYAMA, YOSHIKAZU OKUDA, KEN-ICHI BEPPU,
KENJI HASHIMOTO and HIROSHI YAMAMOTO

The 2nd Department of Anatomy, Nara Medical University

Received May 29, 1989

Summary: The transformed type androgen receptor was isolated from rat testis with a dihydrotestosterone Sepharose affinity column. Its physiological characters were confirmed to retain an androgen binding and a DNA binding activity by biochemical and histochemical studies. The molecular weight of this androgen receptor had about 68,000 daltons with gel chromatography, and was confirmed to consist of a monomer with 65,000 daltons by SDS-PAGE analysis. In an electron microscopic study with rat testis using colloidal gold labeled androgen receptor, from spermatogonia to round spermatids and Sertoli cells, they had a binding activity against the androgen receptor in their cell nuclei, so the androgen hormones may play an important role not only in Sertoli cells but also in spermatogenic cell lines.

Index Terms

androgen receptor, colloidal gold method, electron microscopic study

緒 言

アンドロゲンの生理学的機能は多種多様で, その一つとして精子形成に睾丸性アンドロゲンが重要な働きをしている。このアンドロゲンの発現作用は他のステロイドホルモンと同様の機作で行われていると考えられている。エストロゲン等の最近の研究¹⁾によれば, 核内にある非活性のレセプターに拡散により核内に入ってきたステロイドホルモンが結合し, 複合体を形成して活性化される。この活性化された複合体がクロマチン上のアクセプター部位に結合して標的細胞特異的な遺伝子発現を行うと考えられている。このアクセプター部位の仮説として non-histone protein²⁾, DNA³⁾, DNA-protein complex,

nuclear matrix⁴⁾等が考えられているが, 最近マウス乳癌ウイルス (MMTV) の研究⁵⁾では DNA 自身が acceptor sites であるという報告がある。しかしアクセプター部位については現在のところ不明な点が多く残されている。この論文は colloidal-gold 標識した活性型の transformed androgen receptor を用いて, acceptor sites が DNA であることを組織化学的に示唆した研究結果を報告する。

(1) 材料と方法

(a) 材料

Wister rat (オス) 250 g はオリエンタル酵母株式会社 (大阪) より, testosterone は Sigma, 5 α -dihydrotestosterone: BSA は Makor chemical Co. (Israel) より求めた。

(b) 方法

(1) テストステロンレセプターの単離

(1-a) cytosol の単離

レセプターは Chang (1976)⁶⁾らの方法に基づいて若干修飾した方法で単離した。方法は Wister rat の精巣を 50 mM Tris-HCl, 1.5 mM β -mercaptoethanol, 20 % glycerin, 5 mM phenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF) (pH 7.4) で Waring blender を用いてホモゲナイズし, 105,000 \times g 60 分, 2 $^{\circ}$ C で超遠心して cytosol 分画を得た。

(1-b) DEAE-セルロースクロマトグラフィー

DEAE-セルロース (DE-52) (Whatman Co.) を蒸留水で十分洗浄した後, 活性化した DEAE-セルロースを 50 mM Tris-HCl, 1.5 mM EDTA, 1.5 mM β -mercaptoethanol, 5 mM PMSF (pH 7.4) (TEM) に平衡化した。Cytosol 分画をカラムに吸着させ, TEM 緩衝液で溶出液の OD₂₈₀ が 0 付近になるまで十分洗浄後, Receptor 分画を 0.3 M KCl を含む TEM 緩衝液 (pH 7.4) で溶出した。

(1-c) 5 α -dihydrotestosterone 結合アフィニティーカラムクロマトグラフィー

CNBr 活性化 Sephrose-4B (Pharmacia Co.) を 1 mM HCl で洗浄し, 0.5 M NaCl-0.5 M sodium bicarbonate (pH 8.6) に再懸濁した。これに 1 mg/ml になるように 5 α -dihydrotestosterone: BSA を加え, 37 $^{\circ}$ C, 2 時間反応させた。反応後 1.0 M エタノールアミンで余剰の反応基をブロックし, さらに 1.0 M 酢酸緩衝液 (pH 4.0), 2.0 M NaCl でゲルを洗浄した。

5 α -dihydrotestosterone: BSA-Sepharose 4B カラムを 0.5 M KCl を含む TEM 緩衝液 (pH 7.4) で平衡化し, DEAE 溶出分画をカラムに吸着させた。同じ緩衝液で十分に洗浄後, 100 μ g/ml の testosterone を含む TEM 緩衝液に 4 $^{\circ}$ C, 6 時間ゲルを再懸濁した。ゲル懸濁液を再度カラムに流し, Receptor 分画を回収した。この分画を凍結乾燥にて濃縮した。

(1-d) Gel filtration

SuperoseTM12 (Pharmacia Co.) を 0.5 M KCl を含む TEM 緩衝液 (pH 7.4) で平衡化し, 凍結乾燥試料を 0.5 ml の同じ緩衝液に溶かし Fast protein, Polypeptide, Polynucleotide, Liquid chromatography (FPLC) (Pharmacia, Co.) で 0.5 ml/min の流速でゲル濾過した。各 peak を集め, 凍結乾燥にて濃縮した。又, 分子量は Catalase (M. W.=240,000), Phosphorylase b (M. W.=97,500), Ovalbumin (M. W.=45,000), Cytochrome c (M. W.=12,500) の保持時間を

指標として測定した。

(2) Androgen receptor の物理化学的性質

(2-a) 電気泳動法

電気泳動は Laemmli (1982)⁷⁾らの方法で行い, ラウリル硫酸ナトリウムを含む 12 % Polyacrylamide—0.25 % Bisacrylamide ゲルで BPB がゲル下端に来るまで泳動を行った。ゲルは 5 % Coomassie brilliant blue—7.5 % 酢酸—20 % エタノールで染色した。分子量マーカーは Phosphorylase b (M. W.=97,500), bovine serum albumin (M. W.=68,000), ovalbumin (M. W.=45,000), trypsin inhibitor (M. W.=30,500), cytochrome c (M. W.=12,500) を用いた。

(3) 電子顕微鏡学的研究

(3-a) 固定, 包埋

ラットの精巣, 肝臓, 小腸の 2 mm³ の細片塊を 2.5 % glutaraldehyde—4 % paraformaldehyde を含む 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) で 4 $^{\circ}$ C, 2 時間固定し, 0.25 M sucrose で十分洗浄した後 LR white (London Chemical.) で 60 $^{\circ}$ C, 24 時間重合させ, 超薄切片を作成し使用時まで 4 $^{\circ}$ C で保存した。

(3-b) Androgen receptor with colloidal-gold (ARG) の作成。

17 nm colloidal-gold は Roth ら (1987)⁸⁾の方法により作成した。colloidal-gold 溶液 1 ml (pH 5.3) に 5 μ g の transformed androgen receptor を加え, 3 分後 5 % polyethylene glycol (#20,000) を 20 μ l 加え, 安定化させた。この溶液を 0.05 % polyethylene glycol (#20,000), 5 % glycerol, 0.01 % NaN₃ (PGN) に重層し, 日立 RP65T ローターで, 24,000 rpm, 2 $^{\circ}$ C, 40 分間遠心し, ペレットを 2 ml の PGN 溶液に再懸濁した。このコロイド金溶液を 10~30 % の linear gradient に重層し日立 RP40T ローターで 14,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 30 分間遠心し, 均一粒子径のものを得た。DNase 1-colloidal-gold の作成は Bendyan らの方法⁹⁾に準じて作成した。

(3-c) Post-embedding 法

超薄切片を 0.01 % Triton X-100-PBS (pH 7.4) で 10 分間洗浄し, 最適染色像が得られる様に同溶液で希釈した ARG 液を 37 $^{\circ}$ C, 90 分間反応させた。これを 0.01 % Tween 20-PBS (pH 7.4) で 30 分間洗浄後, 蒸留水で洗い, 酢酸ウラニールにて染色し, 透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察した。

(3-d) DNase I とトリプシン処理

10 μ g/ml に DNase 1 (Sigma) を 10 mM Tris-HCl (pH 7.4)—5 mM MgCl₂ で調整し, パラフィルム上に 50 μ l の drop を作りこれに超薄切片を浮かせ, 37 $^{\circ}$ C, 15 分

間反応させた。反応後、0.01% Triton X-100-PBS (pH 7.4) で5分間3回洗浄後同倍率に希釈した ARG 溶液を 37°C, 90分間反応させた。これ以降は post-embedding と同様に処理後、TEM にて観察した。トリプシン処理は 10 µg/ml にトリプシン (Sigma) を PBS (pH 7.2) に溶解したものを用いて切片を前処理後同様に ARG 染色を行った。

結 果

(1) Androgen receptor の単離

Androgen receptor は testosterone よりも 5 α -dihydrotestosterone に特異的に結合¹¹⁾することを利用して ion exchange chromatography と affinity chromatography を用いて精製した。ラットの精巣から

の 105,000 x g で超遠心後の cytosol 分画を DEAE-セルロースカラムに吸着させ、0.3 M KCl で Androgen receptor を含む分画を溶出した。この分画を 5 α -dihydrotestosterone: BSA-Sepharose アフィニティカラムにより testosterone receptor を得た。のアフィニティ吸着分画を superose™12 により分画すると分子量約 68 K daltons の peak と他は 5,000 daltons 以下で free の testosterone と考えられる。

この 2 peak を SDS-PAGE にかけると最初の peak の分子量は 65,000 daltons であった (Fig. 1)。我々は 65,000 daltons の androgen receptor を DEAE-cellulose と 5 α -dihydrotestosterone affinity gel により精製することができた。

(2) Histological study

ラットの精巣より精製した Androgen receptor の細胞成分への結合能を調べる目的で Androgen receptor を colloidal-gold で標識して postembedding method により染色を行った。用いた組織は標的組織であるラットの精巣、肝臓、非標的組織である小腸等を用いた。Colloidal-gold labeled androgen receptor で精巣を染色すると seminal tubules 内の spermatogonia, primary spermatocyte (Fig. 2a), round spermatid (Fig. 2b) 等及び Sertoli cell (Fig. 2c) の核に特異的に染色された。しかし late spermatid (Fig. 2d) の核にはほとんど染色されなかった。又、細胞質にもほとんど金粒子は認められなかった。肝臓の核も同様に強く染色された。しかし非標的組織である小腸には核も細胞質も共に同程度に染色され特異的な染色性は認められなかった。核内での染色パターンはどの細胞を調べても同様で、primary spermatocyte の pachytene stage (Fig. 3) で示す様に電子密度の高い condensed chromatin に少なく、より電子密度の低い chromatin 上に金粒子の分布が認められた。次にこの 65,000 daltons の Androgen receptor が protein に結合しているのか DNA に結合しているのかを調べた。肝臓の超薄切片を trypsin (10 µg/ml) 処理後、同様に colloidal-gold labeled androgen receptor で染色するとそのパターンは全く変わらなかった (Fig. 4)。さらに 17 nm colloidal-gold labeled DNase I で切片を染色後、5 nm colloidal-gold labeled androgen receptor で同一面で二重染色すると 5 nm コロイド金粒子はほとんど認められず、17 nm コロイド金粒子のみであった (Fig. 5)。このことから 65,000 daltons の androgen receptor は DNA に結合していることを示した。

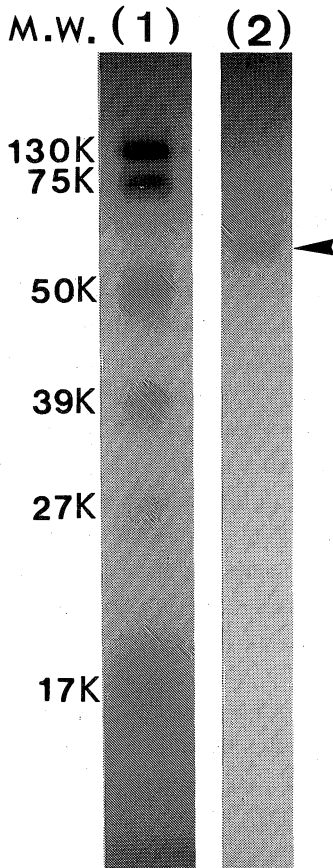


Fig. 1. SDS-PAGE analysis of the transformed androgen receptor. Marker proteins (lane 1) and purified androgen receptor (lane 2).

考 察

今回ラットの精巣より transformed type androgen receptor を DEAE-セルロースと 5 α -dihydrotestosterone アフィニティーカラムの2ステップ法により精製し、その生物学的性状を組織化学的に検討を行った。

ラットの精巣の cytosol 分画 (蛋白質として約 1.6 gr) を DEAE-セルロースで 0.3 M KCl 溶出分画として得た。この DEAE-セルロース溶出分画 (約 13.5 mg) を 5 α -dihydrotestosterone アフィニティーカラに吸着させ、過剰の testosterone を加えることにより、5 α -dihydrotestosterone に親和性を持つ蛋白質を回収した。ゲル濾過後に得られた蛋白質は約 10 μ g 程度であった。Chang⁹⁾らは transformed androgen receptor を DEAE-セルロース, DNA セルロース, testosterone アフィニティーカラムにより精製を行っているが, testosterone は従来の研究からは核内の種々の蛋白質へ結合することが報告¹⁰⁾されている。一方 dihydrotestosterone は核内の一種類の蛋白質 (androgen receptor) へのみ親和性を示すことが Wright ら (1979)¹¹⁾により報告されている。このことから dihydrotestosterone アフィニティーカラムを用いれば、より少ないステップで特異的に androgen receptor を精製することができると考えられ、今回この方法で効率よく transformed type androgen receptor を精製出来た。この transformed androgen receptor にコロイド金標識を行い、細胞内のどの細胞に親和性を示すかをラットの精巣、肝臓、小腸を用いて検索を行った結果、精巣や肝臓のような標的臓器の細胞の核の電子密度の低い領域、即ち転写活性の高い部位と考えられている領域に特異的に染色を示し、小腸の様な非標的臓器ではほとんど特異的に染色されなかった。この結果は androgen receptor が標的臓器の細胞の核内の特定の領域を認識して結合していることを示しており、近年、活性化された receptor が核内のステロイドホルモン応答遺伝子の特定の DNA 領域へ結合することが報告⁵⁾されており、今回示した colloidal-gold labeled androgen receptor の核内分布の電顕像がこれに相当する領域を示している可能性がある。これを支持する結果はコロイド金標識した DNase 1 と colloidal-gold labeled

androgen receptor による同一面での二重染色の結果、DNase 1 感受性部位とは異なる領域への結合とトリプシン処理後の切片での実験結果から androgen receptor が結合する相手は蛋白質ではなく DNA (DNA への結合実験はここでは示していないが結合することを確認してある) へ結合することから、androgen receptor はホルモン応答遺伝子に相当する DNA の近傍へ結合していると考えられる。

今回作製した transformed androgen receptor は以上のことからアンドロゲンホルモン結合部位と DNA 結合部位を持ったものであることが判明した。

お わ り に

本論文の要旨は第 93 回日本解剖学会総会 (1984 年 4 月, 名古屋) において発表した。

文 献

- 1) King, W. J. and Greene, G. L.: Nature 307: 745-747, 1984.
- 2) Puca, G. A., Sica, V. and Nola, E.: Proc. Natl. Acad. Sci. 71: 979-983, 1974.
- 3) Kallos, J., Fasy, T. M., Hollaner, V. P. and Bick, M. D.: Proc. Natl. Acad. Sci. 75: 4896-4900, 1978.
- 4) Barrack, E. R., Hawkins, E. F., Allen, S. L., Hicks, L. L. and Coffey, D. S.: Biochem. Biophys. Res. Comm. 79: 829-836, 1977.
- 5) Scheidereit, C., Geisse, S., Westphal, H. M. and Bento, M.: Nature 304: 749-752, 1983.
- 6) Chang, C. H., Rowly, D. M., Lobl, T. J. and Tindal, D. J.: Biochemistry 21: 4102-4109, 1982.
- 7) Laemmli, V. K.: Nature 227: 680-685, 1970.
- 8) Roth, J., Bendayan, M. and Orci, L.: J. Histochem. Cytochem. 26: 1074-1081, 1978.
- 9) Bendayan, M.: J. Histochem. Cytochem. 29: 531-541, 1981.
- 10) Isoma, V., Parvinen, M., Janne, O. A. and Bardin, C. W.: Endocrinology 116: 132-137, 1985.
- 11) Wright, W. and Frankel, A. I.: Endocrinology 104: 1580-1587, 1979.

Explanation of figures

- Fig. 2. Post-embedding method by the colloidal gold labeled androgen receptor.
 (a). Pachytene stage in primary spermatocyte. Sex vesicle (SV) and nucleolus (NO).
 (b). Round spermatid.
 (c). Sertoli cell.
 (d). Late spermatid.
- Fig. 3. Post-embedding method with colloidal gold labeled androgen receptor. The figure was pachytene stage.
- Fig. 4. Post-embedding method with trypsin treatment.
 The section was treated with trypsin and then assayed with colloidal labeled androgen receptor, in the pachytenen stage.
- Fig. 5. Doublely stained post-embedding method.
 The colloidal gold (17 nm, arrowhead) labeled DNase I was assayed and then, on the same grid surface, the colloidal gold (5 nm, arrow) labeled androgen receptor was stained. The figure was pacytene stage.

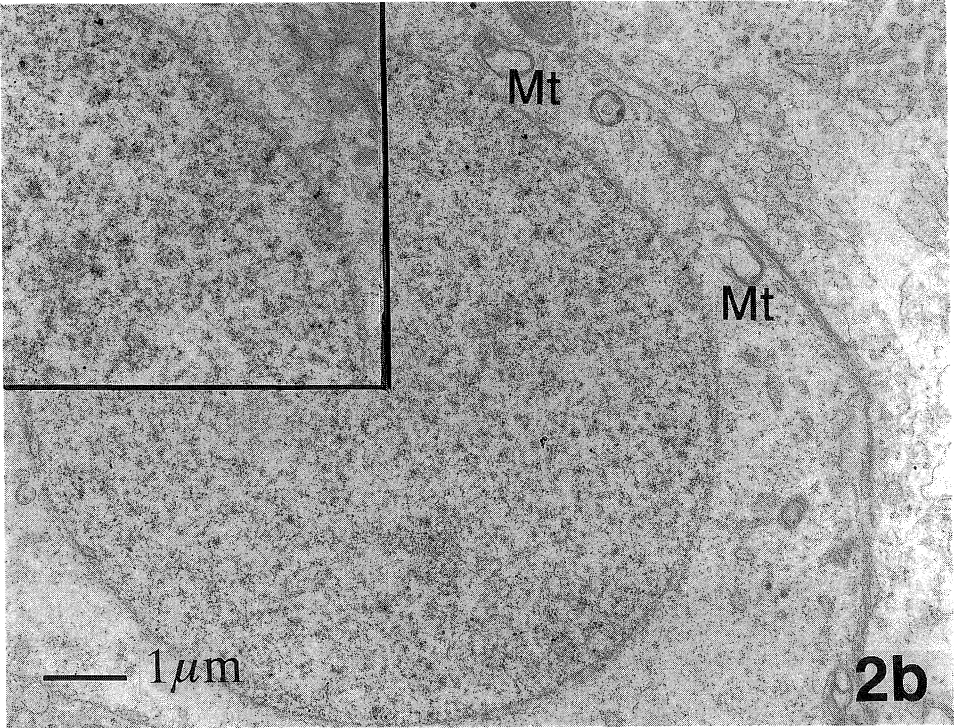
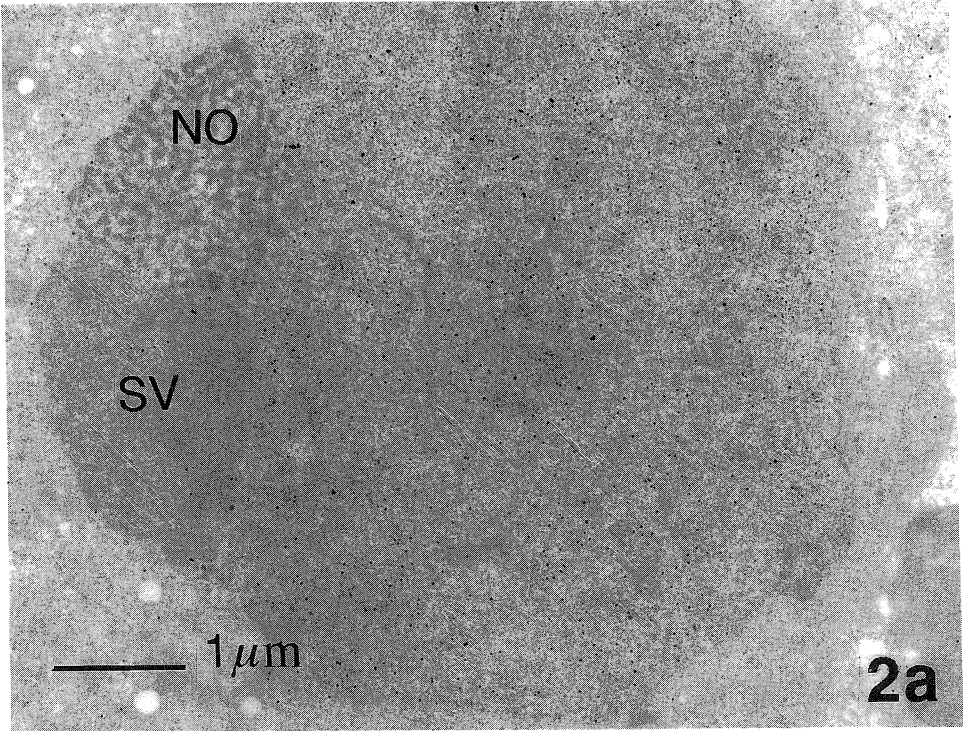


Fig. 2.

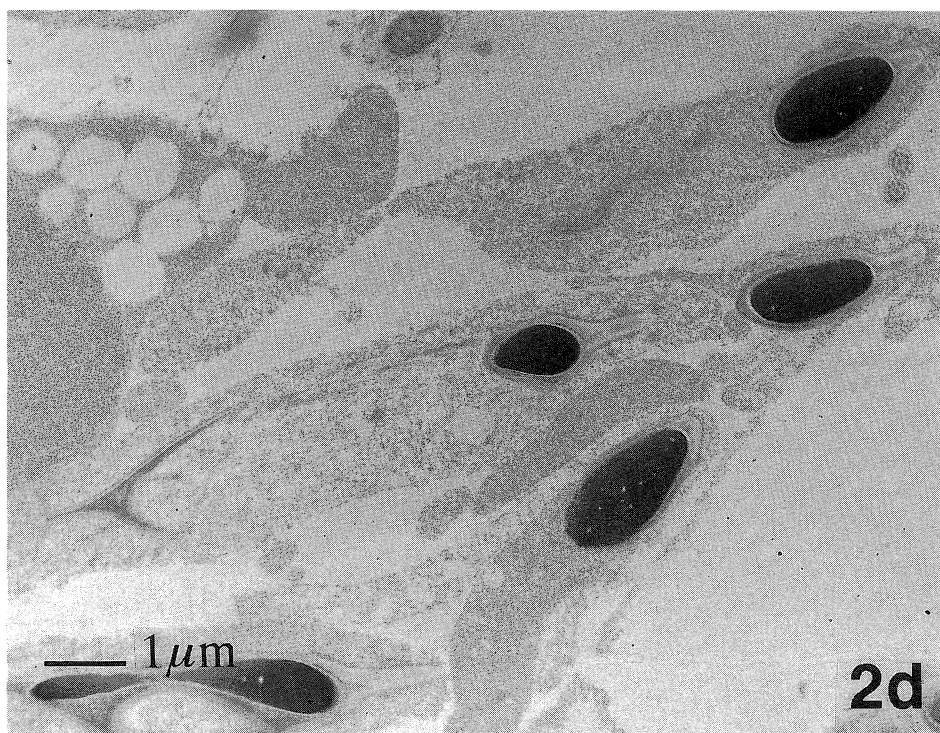
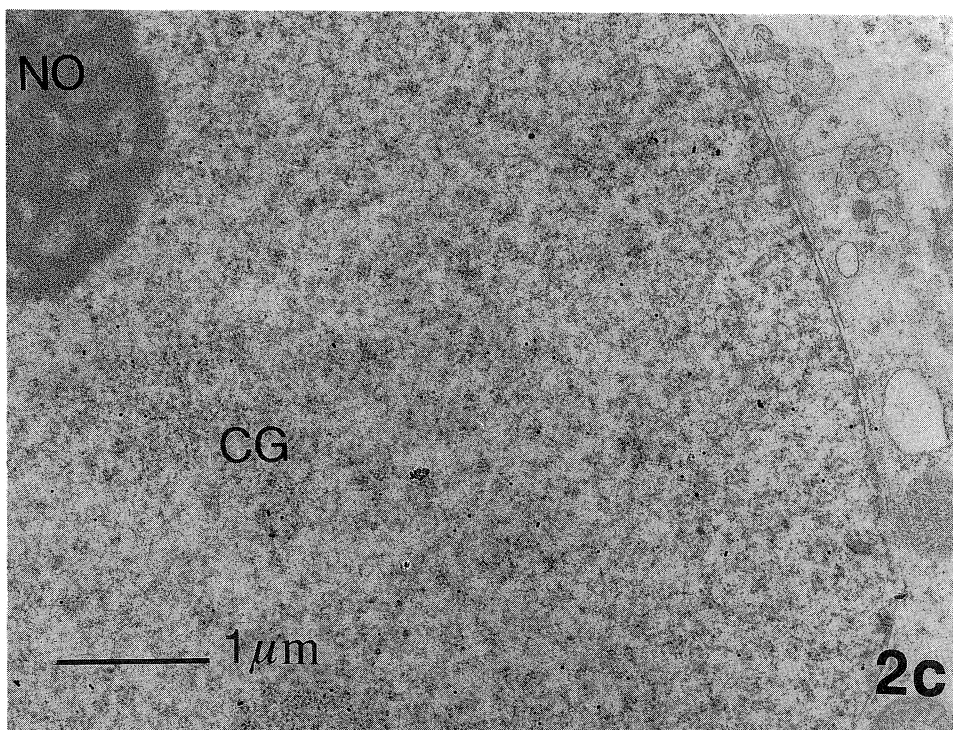


Fig. 2.

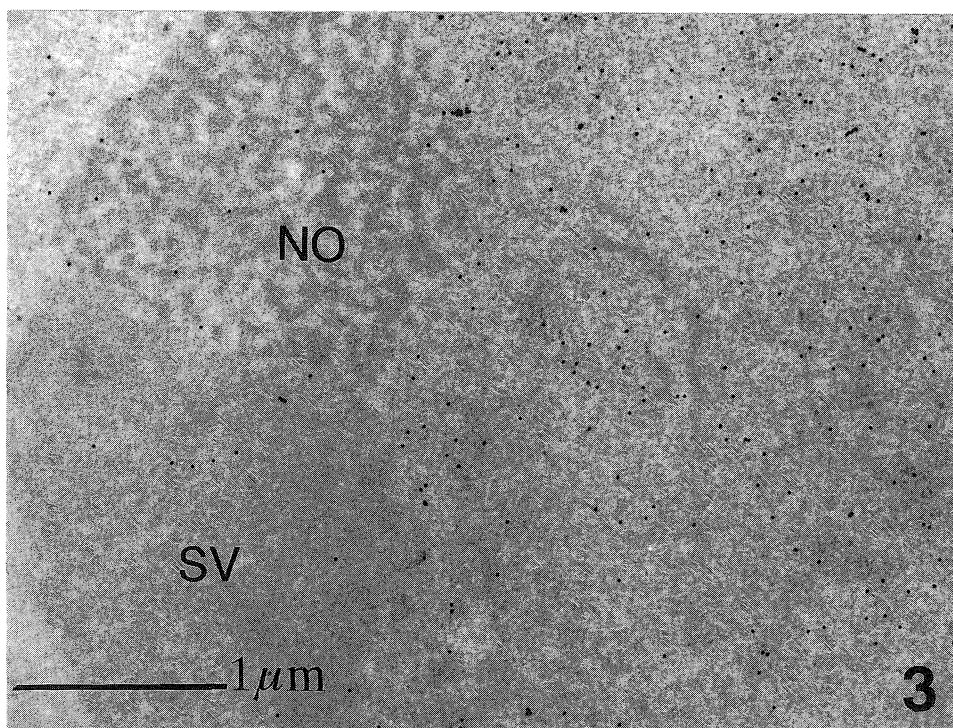


Fig. 3.

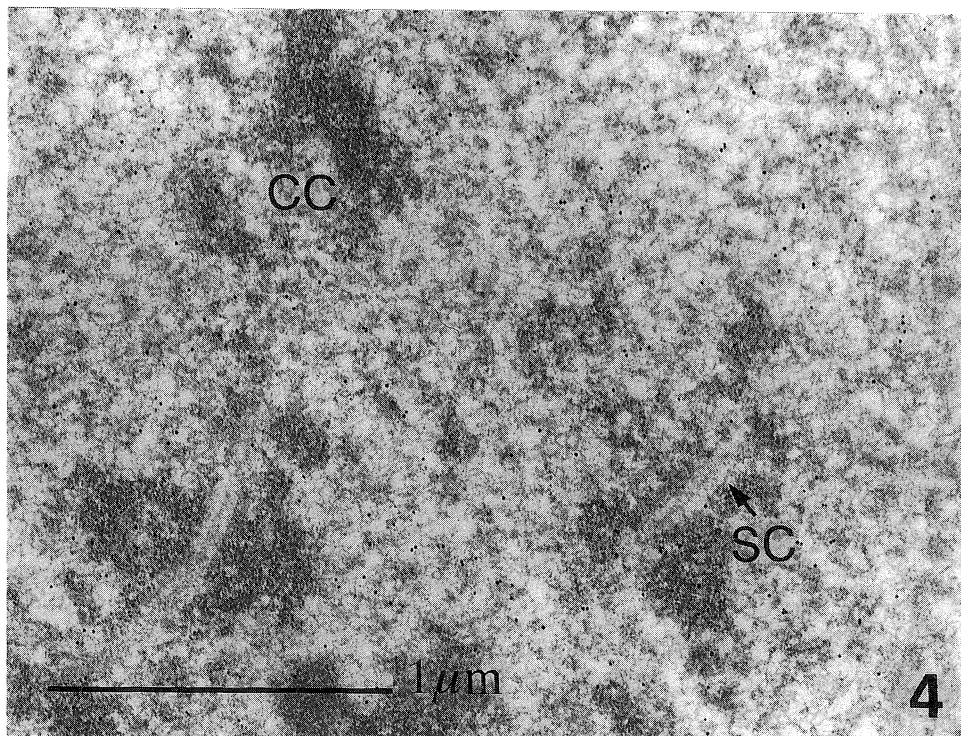


Fig. 4.

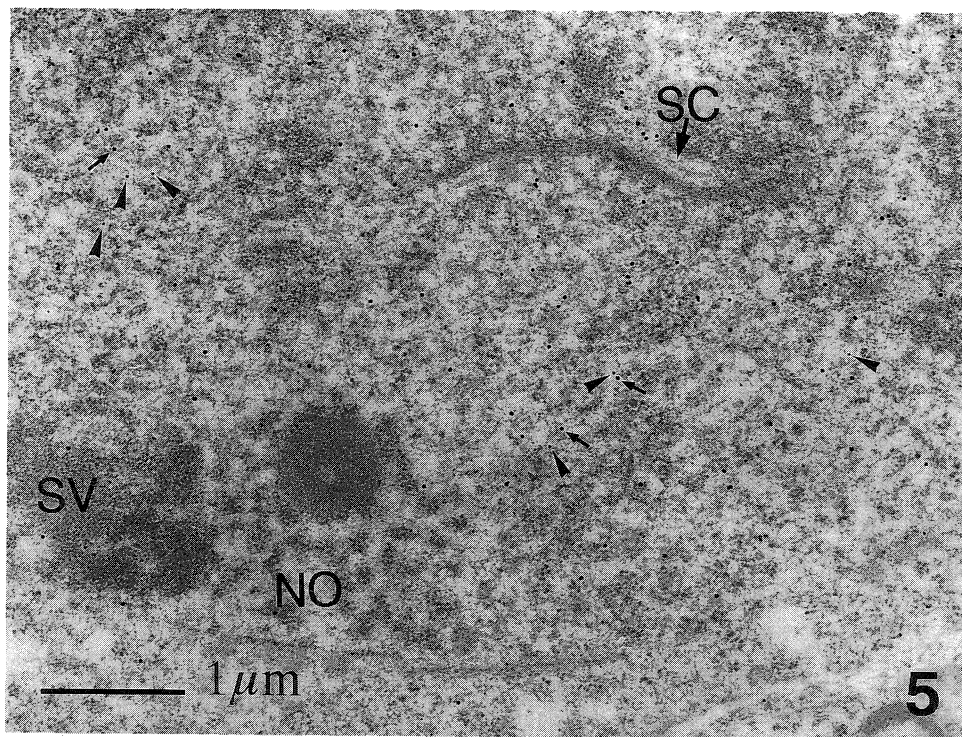


Fig. 5.